



Molecular pathology of premalignant lesions of rodent colon cancer; identification of  $\beta$ -catenin-accumulated crypts and its significance on colon carcinogenesis 1) Frequent  $\beta$ -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis 2) Sequential analysis of morphological and biological properties of  $\beta$ -catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山田, 泰広 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/14963">http://hdl.handle.net/20.500.12099/14963</a>

氏名 (本籍)	山田泰広 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1309 号
学位授与日付	平成 14 年 5 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Molecular pathology of premalignant lesions of rodent colon cancer; identification of $\beta$ -catenin-accumulated crypts and its significance on colon carcinogenesis 1) Frequent $\beta$ -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis 2) Sequential analysis of morphological and biological properties of $\beta$ -catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis
審査委員	(主査) 教授 森 秀 樹 (副査) 教授 岡野 幸雄 教授 森脇 久隆

### 論文内容の要旨

大腸発癌過程は、形態学的に多段階発癌の概念を最も典型的に表すものと考えられる。Vogelsteinらが示したように、大腸発癌では、遺伝子変化の蓄積に従いその形態も変化し、徐々に異型性を増強させ、ついには癌へと進展するという過程が一般的に受け入れられてきた。Aberrant crypt foci (ACF)は、carcinogen投与後早期の大腸粘膜表面に、メチレンブルー染色にて観察される病変で、1987年にBirdらによって報告された。ACFは大腸発癌過程において出現する最も早期にとらえる形態学的変化であり、それ故に前癌病変として認識されてきた。実際ACFにおいて細胞増殖能が亢進していることや、K-ras遺伝子変異の存在が報告されるなど、前癌病変としてのACFを裏付ける報告が多数見られ、ヒトでも類似する病変が知られてきた。しかしながらACFと腫瘍との発生パターンの相違や、組織学的特徴の隔たりなど、ACFを前癌病変とすることに対する疑問も生じていた。本研究では大腸前癌病変の性質を検討するために、形態学的検索と共に分子生物学的検索を行った。特に、大腸発癌過程においてgate keeperとしての役割が知られる、 $\beta$ -catenin signaling pathwayに着目して、 $\beta$ -catenin遺伝子変異およびその蛋白の蓄積を中心に検索を行った。

#### 研究材料と方法

6週齢雄F344ラットにアゾキシメタン(AOM)を皮下投与(15 mg/kg体重、週1回、計3回)し、5週、10週、20週後に屠殺した。大腸を摘出後、直ちにホルマリン固定(24時間)を行った。粘膜は水平にパラフィンに包埋後、連続切片を作製し、通常のHE染色と同時に組織化学的、免疫組織化学的に検索を行った。増殖能の変化はAgNOR染色を用いて検索した。また微小病変に対して、laser capture microdissection (LCM)システムを使用しDNAを抽出後、 $\beta$ -catenin遺伝子のexon 3をPfu polymeraseにて増幅、PCR-SSCP法にて変異をスクリーニングし、ダイレクトシーケンス法にてシーケンスを行った。

#### 結果および考察

前癌状態大腸粘膜にはACF以外の、異型腺管の存在を認めた。それらの病変は、経時的にサイズおよび異型度が増加し、Paneth細胞を思わせる好酸性顆粒を有する細胞を伴っていた。同時に、それらは $\beta$ -catenin遺伝

子

exon3の変異を頻繁に有し、 $\beta$ -catenin蛋白の細胞質および核への蓄積を全例に認めた (BCAC;  $\beta$ -catenin-accumulated crypts)。興味深いことに、ACFではその組織学的異型性は時間を経ても変化が無く、明らかな $\beta$ -catenin蛋白の蓄積は見られなかった。さらに $\beta$ -catenin遺伝子変異の頻度はACFに比しBCACの方が高く、BCACにおける細胞増殖能もACFより有意に上昇していることが分かった。またBCACは強い大腸発癌抑制効果が知られる選択的COX-2 inhibitor, celecoxibによりACFよりも強くその形成が抑制された。 $\beta$ -Catenin遺伝子exon3の変異はこのモデルの大腸癌に高頻度に報告されており、 $\beta$ -catenin蛋白の細胞質および核への蓄積も全例の大腸癌に確認されている。本研究の結果は、AOM投与後早期のラット大腸粘膜内にACF以外の形態を有する異型腺管集団(BCAC)が存在することを示し、さらにBCACがACFより直接的な大腸癌の前駆病変であることを示唆するものと考えられた。同時にこのような結果は、 $\beta$ -catenin遺伝子変異およびその蛋白の蓄積という、 $\beta$ -catenin signaling pathwayの活性化が、粘膜内病変という大腸発癌過程で検出可能な最も早期の病変に関与していることを示し、さらにPaneth細胞への分化が大腸発癌早期に関与していることを示唆するものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 山田 泰広は、前癌状態のラット大腸粘膜内にはACF以外の形態を有する異型腺管集団が存在すること、そしてそれらが直接の大腸癌前癌病変である可能性を示した。本研究の成果は、腫瘍病理学の進歩に少なからず寄与するものと認められる。

---

#### 主論文公表誌

Molecular pathology of premalignant lesions of rodent colon cancer; identification of  $\beta$ -catenin-accumulated crypts and its significance on colon carcinogenesis

1) Frequent  $\beta$ -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis.

Cancer Res. 2000; 60: 3323-3327

2) Sequential analysis of morphological and biological properties of  $\beta$ -catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis.

Cancer Res. 2001; 61: 1874-1878